

Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Etil Asetat Daun Sungkai (*Peronema canescens* jack.) dan Uji Aktivitas Imunomodulator

Wulan Safitri¹, Madyawati Latief^{1*}, Nindita Clourisa Amaris Susanto¹

¹Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Jambi, Indonesia

ABSTRAK

Sungkai (*Peronema canescens* Jack.) merupakan tumbuhan asli Indonesia yang secara tradisional digunakan sebagai penurun panas, obat malaria dan meningkatkan daya tahan tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa pada ekstrak etil asetat daun sungkai dan menguji aktivitas imunomodulator pada senyawa tersebut. Daun sungkai dilakukan maserasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol, selanjutnya skrining fitokimia ekstrak etil asetat daun sungkai, dilanjutkan proses isolasi menggunakan metode KVC dan diperoleh isolat pada F3. Skrining fitokimia isolat F3 mengandung senyawa steroid. Uji aktivitas imunomodulator menunjukkan bahwa pada EEADS 50 mg/Kgbb, 150 mg/Kgbb, 450 mg/Kgbb, K+ dan isolat terjadi peningkatan jumlah leukosit dan % aktivitas makrofag daripada K-. Perlakuan EEADS 50 mg/Kgbb, 150 mg/Kgbb dan isolat 0,7 mg/Kgbb tidak berbeda nyata dengan K- tetapi berbeda nyata dengan perlakuan EEADS 450 mg/Kgbb dan K+. Pada dosis 450 mg/Kgbb terjadi peningkatan leukosit dan % aktivitas makrofag paling tinggi yang hampir mendekati K+ (*Imboost* 0,7 mg/Kgbb). Spektrum UV-Vis isolat F3 menunjukkan puncak serapan maksimum pada 267 nm yang menandakan adanya ikatan rangkap nonkonjugasi. Spektrum FTIR menunjukkan isolat memiliki gugus O-H ($3381,13\text{cm}^{-1}$), C-H alifatik ($2939,10\text{cm}^{-1}$), C=C ($1631,44\text{cm}^{-1}$), C-H ($1449,42\text{-}1362,82\text{cm}^{-1}$), dan C-O ($1022,32\text{cm}^{-1}$). Berdasarkan perbandingan literatur, pola spektrum UV-Vis dan FTIR isolat F3 memiliki kemiripan dengan spektrum UV-Vis dan FTIR senyawa golongan steroid yaitu β -Sitosterol.

Kata kunci: Fagositosis Makrofag; Imunomodulator; Leukosit; *Peronema canescens* Jack

ABSTRACT

Sungkai (*Peronema canescens* Jack.) is a plant native to Indonesia that is traditionally used for dehumidifiers, treating malaria and increasing endurance. This study aims to isolate the compounds in the ethyl acetate extract of sungkai leaves and test the immunomodulatory activity of these compounds. Sungkai leaves were carried out stratified maceration using n-hexane, ethyl acetate and methanol solvents, then phytochemical screening of ethyl acetate extract of sungkai leaves, followed by an isolation process using the KVC method and isolates were obtained on F3. Phytochemical screening of F3 isolates contains steroid compounds. Immunomodulatory activity tests showed that in EEADS 50 mg/Kgbb, 150 mg/Kgbb, 450 mg/Kgbb, K+ and isolates there was an increase in the number of leukocytes and % macrophage activity compared to K-. The EEADS treatment of 50 mg/Kgbb, 150 mg/Kgbb and isolates of 0.7 mg/Kgbb did not differ markedly from K- but differed markedly from the EEADS treatment of 450 mg/Kgbb and K+. At a dose of 450 mg/Kgbb there was an increase in leukocytes and the highest % macrophage activity which was almost close to K+ (*Imboost* 0.7 mg/Kgbb). The UV-Vis spectrum of the F3 isolate shows a maximum absorption peak at 267 nm indicating the presence of a nonconjugation double bond. The FTIR spectrum shows isolates have groups O-H (3381.13cm^{-1}), aliphatic C-H (2939.10cm^{-1}), C=C (1631.44cm^{-1}), C-H ($1449.42\text{-}1362.82\text{cm}^{-1}$), and C-O (1022.32cm^{-1}). Based on the literature comparison, the pattern of the UV-Vis spectrum and FTIR of F3 isolates has similarities with the UV-Vis and FTIR spectrum of steroid group compounds, namely β -Sitosterol.

Keywords: Macrophage Phagocytosis, Immunomodulators, Leukocytes, *Peronema canescens* J

Received: 26-09-2022, Accepted: 10-01-2024, Online: 11-09-2024

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang kaya akan tumbuh-tumbuhan dengan berbagai macam

*Corresponding author:

wulansafitri468@gmail.com

tanaman obat yang banyak dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Keanekaragaman hayati yang dimiliki oleh bangsa Indonesia berbentuk flora berupa lebih dari 30.000 spesies tanaman dan 940 spesies diantaranya diketahui berkhasiat sebagai obat atau digunakan sebagai bahan obat. Indonesia memiliki potensi besar untuk mengembangkan dan memanfaatkan tanaman obat sebagai obat herbal. Salah satu tanaman yang ada di wilayah Indonesia tepatnya di Provinsi Jambi Kabupaten Kerinci yang berpotensi sebagai tanaman obat yaitu sungkai. Bagian dari tanaman sungkai yang biasa dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat tradisional yaitu bagian kulit batang dan bagian daun sungkai.

Daun sungkai dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat tradisional seperti obat pilek, penurunan panas, sebagai obat kumur pencegah sakit gigi dan obat cacingan (ringworms). Selain itu, masyarakat di Kabupaten Kerinci memanfaatkan air rebusan daun sungkai sebagai minuman herbal untuk meningkatkan daya tahan tubuh dan air rebusan kulit batang sungkai biasa digunakan sebagai obat cacar. Menurut Yani (2013), masyarakat suku Lembak memanfaatkan seduhan daun sungkai untuk penurunan panas, mengobati malaria dan menjaga kesehatan.

Berdasarkan penelitian Latief dkk., (2021), daun sungkai positif senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, tanin dan fenolik. Pada fraksi etil asetat daun sungkai mengandung senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, tanin dan fenolik (Ramadenti dkk., 2017). Daun sungkai mengandung senyawa aktif yang bermanfaat untuk kesehatan dan meningkatkan sistem imun tubuh berupa alkaloid, flavonoid, steroid dan tannin. Senyawa yang terdapat dalam daun sungkai tersebut mampu melawan serangan infeksi virus, bakteri maupun mikroba serta menaikkan jumlah leukosit (Suhirman & Balitro, 2020). Leukosit merupakan sel yang membentuk komponen darah yang berperan dalam imunitas atau pertahanan tubuh terhadap benda asing maupun mikroorganisme (Firani, 2018).

Imunomodulator merupakan senyawa yang mampu meningkatkan fungsi sistem imun tubuh (Devagaran, 2012). Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun muda sungkai pada mencit terdapat pengaruh yang signifikan dalam meningkatkan leukosit namun tetap dalam rentang yang normal. Jika dibandingkan dengan imunos, ekstrak daun sungkai dosis 0,5625 mg/Kgbb lebih baik dalam meningkatkan sistem imun sebesar 36,4% dari perlakuan kontrol (Irwanto dkk., 2014). Infusa daun sungkai (*Peronema canescens*) memiliki efek imunomodulator yang bekerja dengan meningkatkan jumlah leukosit pada mencit jantan (Rahman dkk., 2021).

Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi senyawa metabolit sekunder dari ekstrak etil asetat daun sungkai dan isolat yang diperoleh akan diuji aktivitas imunomodulator. Pemilihan pelarut etil asetat dikarenakan berdasarkan penelitian terdahulu ekstrak etil asetat daun sungkai mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, steroid, alkaloid, fenol dan tanin yang berpotensi sebagai imunomodulator

METODE PENELITIAN

Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan yaitu Daun Sungkai (*Peronema Canescens* Jack) yang diperoleh dari Desa Koto Baru Hiang, Kecamatan Sitinjau Laut, Kabupaten Kerinci, Provinsi Jambi. Daun sungkai yang masih segar dibersihkan untuk menghilangkan kotoran. Selanjutnya daun sungkai dipotong kecil-kecil, lalu dikeringkan pada suhu kamar di ruang yang tidak terkena cahaya matahari langsung. Selanjutnya sampel dihancurkan menjadi ukuran yang lebih kecil menggunakan grinder untuk memperluas permukaan sampel.

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu n-heksana, etil asetat, metanol, pereaksi dragendroff, pereaksi mayer, serbuk Mg, HCl 2N, HCl pekat, FeCl₃, asam sulfat pekat, asam asetat anhidrat, silika gel dan aquades. Bahan yang digunakan untuk pengujian aktivitas imunomodulator yaitu bakteri *Staphylococcus aureus*, Imboost force sebagai kontrol positif,

Na-CMC 0,5% sebagai kontrol negatif, hewan uji (mencit jantan), Nutrient Agar (NA), pewarna giemsa.

Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan diantaranya rotary evaporator, botol maserasi, kolom (pyrex), peralatan gelas (gelas ukur, erlenmeyer, labu ukur, gelas beaker), plat tetes, plat KLT, kertas saring, kaca arloji, inkubator, pipet tetes, tabung reaksi, mortar alu, pipa kapiler, corong pisah, batang pengaduk, neraca analitik, timbangan hewan, spuid injeksi 1 mL, alat sonde, botol kaca/vial, bunsen, mikroskop, pisau bedah, pinset, kawat ose, kaca objek, spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

Skrining Fitokimia (Harbone, 1987)

Uji Alkaloid. Sebanyak 1 mL sampel dilarutkan dalam beberapa tetes asam sulfat 2N, kemudian diuji dengan tiga pereaksi alkaloid yaitu pereaksi Dragendroff, pereaksi Meyer. Hasil uji dinyatakan positif apabila dengan pereaksi Dragendroff terbentuk endapan merah hingga jingga, dengan pereaksi Meyer terbentuk endapan putih kekuningan.

Uji Flavonoid. Sebanyak 1 mL sampel ditambahkan beberapa tetes HCl pekat lalu dimasukkan serbuk Mg. Hasil positif dari pereaksi HCl dan serbuk Mg ini ditandai dengan terbentuknya buih dan perubahan warna larutan menjadi jingga.

Uji Saponin. Saponin dapat dideteksi dengan uji busa di dalam air panas. Busa yang stabil yang dapat bertahan lama dan tidak hilang pada penambahan 1 tetes HCl 2N menunjukkan adanya saponin.

Uji Tanin. Sejumlah sampel ditambahkan FeCl₃ kemudian campuran dihomogenkan. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kehijauan pada campuran.

Uji Steroid dan Triterpenoid. Sejumlah sampel ditambahkan dengan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat (pereaksi Liebermann-Burchard). Apabila terbentuk warna biru atau hijau menandakan adanya steroid. Apabila terbentuk warna ungu atau jingga menandakan adanya triterpenoid.

Ekstraksi

Satu (1) kg daun sungkai yang telah kering dimaserasi bertingkat dimulai dengan pelarut n-heksana selama 2 × 24 jam. Maserat yang diperoleh kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring dan dipisahkan dengan rotary evaporator sampai didapatkan ekstrak n-heksana pekat dan ditimbang beratnya. Proses maserasi dilanjutkan dan dilakukan dengan perlakuan sama menggunakan pelarut etil asetat dan metanol.

Isolasi Senyawa

Kromatografi vakum cair (KVC) menggunakan fase diam (silika gel). Sampel diimpregnasi menggunakan silika gel, kemudian dimasukkan ke dalam kolom yang telah berisi fase diam. Sedangkan fase gerak yang digunakan yaitu n-heksana: etil asetat dan etil asetat: metanol dengan variasi perbandingan (10:0; 9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5; 4:6; 3:7; 2:8; 1:9 dan 0:10). Fraksi yang diperoleh ditampung dalam botol vial, eluat yang ditampung berdasarkan tiap pita yang didapat kemudian diuapkan. Hasil dari kromatografi kolom dilakukan KLT kembali. Eluat yang memiliki pola noda identik digabungkan berdasarkan nilai R_f pada kromatogram. Fraksi yang masih memiliki banyak spot noda maka dilanjutkan pemisahan lagi menggunakan kromatografi kolom gravitasi (KKG). Eluat yang memiliki satu spot noda kemudian diuji menggunakan 3 eluen berbeda, jika hasil KLT tetap satu spot noda maka didapatkan isolat. Isolat dimurnikan dengan rekristalisasi menggunakan pelarut n-heksana dan etil asetat. Selanjutnya dilakukan skrining fitokimia pada isolat yang diperoleh.

Karakterisasi Senyawa

Spektrofotometer UV-Vis. 2 mL Isolat dimasukkan dalam kuvet dan diamati spektrumnya pada panjang gelombang 200-800 nm untuk diidentifikasi nilai absorbansi senyawa aktif pada panjang gelombang maksimal.

Spektrofotometer FTIR. 1 tetes isolat dicampurkan dengan 0,2 g pelet KBr, dikeringkan kemudian diidentifikasi dengan spektrofotometer FTIR pada bilangan gelombang 4000-400 cm⁻¹.

Uji Aktivitas Imunomodulator

Aklimatisasi hewan coba. Sebelum digunakan sebagai hewan percobaan, semua mencit terlebih dahulu diadaptasikan (aklimatisasi) terhadap lingkungan selama \pm 7 hari untuk kontrol kondisi kesehatannya. Hewan coba hanya diberi makan dan minum setiap hari (Haeria et al., 2017).

Perlakuan pada Hewan Percobaan

Mencit dikelompokkan secara acak dan dibagi menjadi 6 kelompok dengan tiap kelompok terdiri dari 3 ekor mencit. Dosis yang digunakan mengacu pada Haeria et al., (2017). Pembagian kelompok perlakuan sebagai berikut:

Kelompok I: kontrol positif (K+), diberikan Imboost force 0,7 mg/Kgbb

Kelompok II: kontrol negatif (K-), mencit diberikan Na-CMC 0,5%

Kelompok III: mencit diberikan EEADS dengan dosis 50 mg/Kgbb

Kelompok IV: mencit diberikan EEADS dengan dosis 150 mg/Kgbb

Kelompok V : mencit diberikan EEADS dengan dosis 450 mg/Kgbb

Kelompok VI: mencit diberikan isolat dengan dosis 0,7 mg/Kgbb

* EEADS = Ekstrak etil asetat daun sungkai

Perhitungan Jumlah Leukosit (Irwanto et al., 2014)

Perlakuan pada mencit dilakukan dengan metode gavage sesuai kelompok perlakuan secara acak. Perlakuan dilakukan dengan 1 kali gavage pada siang hari. Sebelum digavage, berat badan mencit ditimbang terlebih dahulu. Data berat badan tersebut digunakan untuk menentukan jumlah EEADS, isolat dan volume larutan Na-CMC 5% serta Imboost force yang diberikan. Setelah 24 jam, sebanyak 1 ml darah diambil melalui sayatan pada ujung ekor, darah dimasukkan ke dalam tube yang telah berisi K3-EDTA. Jumlah sel leukosit diperiksa di Balai Laboratorium Kesehatan Provinsi Jambi.

Pengujian Aktivitas Fagositosis Sel Makrofag

Pembuatan Suspensi Bakteri. Bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* yang ditanam pada media agar miring diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C. Bakteri uji diambil menggunakan kawat ose steril lalu disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi 2 mL larutan NaCl 0,9 % hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan Mc.Farland (Ngajow, 2013). Kekeruhan bakteri diukur sesuai dengan standar kekeruhan Mc. Farland 0,5 menggunakan spektrofotometer 20 D pada Panjang gelombang 625 nm. Larutan Mc Farland dibuat dengan komposisi 0,05 mL BaCl₂ 1% dan 9,95 mL H₂SO₄.

Uji Fagositosis

Pada hari kedelapan, setiap mencit diinfeksi infraperitoneal dengan 0,5 ml suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dan dibiarkan selama satu jam. Mencit dianestesi dengan cylazin:ketamin lalu dibedah perutnya dengan menggunakan gunting bedah dan pinset steril. Cairan peritoneum diambil menggunakan spuit 1 mL. Cairan peritoneal dipulas pada gelas objek dan difiksasi dengan metanol selama 5 menit, kemudian diwarnai dengan pewarnaan Giemsa, didiamkan 20 menit, dibilas dengan air mengalir. Setelah sediaan kering, diamati di bawah mikroskop menggunakan minyak emersi dengan perbesaran (10x-1000x) (Nugroho, 2012).

Menghitung Aktivitas Fagositosis

Aktivitas imunomodulator ditentukan dengan menghitung aktivitas fagositosis sel makrofag peritoneum mencit. Nilai aktivitas fagositosis adalah persentase sel makrofag yang aktif melakukan proses fagositosis di antara 100 sel makrofag (Masurin dan Chairul, 2012).

$$\% \text{Aktivitas fagositosis} = \frac{\text{jumlah sel makrofag aktif}}{\text{jumlah sel makrofag teramati}} \times 100\%$$

Analisis Data

Analisis fitokimia. Analisis fitokimia dilakukan dengan cara melihat adanya reaksi antara reagen dengan sampel yang digunakan. Reaksi ditandai dengan timbulnya perubahan warna, endapan atau terbentuknya lapisan serta suhu.

Karakterisasi Senyawa. Karakterisasi senyawa dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. Analisis UV-Vis dilakukan dengan melihat panjang gelombang dari puncak sampel yang terbentuk pada panjang gelombang 200-400 nm. Selanjutnya analisis FTIR dilakukan dengan melihat bilangan gelombang dari spektrum sampel yang berikatan dengan spektrum senyawa organik, yaitu pada bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1} .

Aktivitas Imunomodulator. Data hasil Penelitian diolah secara statistik menggunakan analisis varian (ANOVA) satu arah dan dilanjutkan dengan uji Tukey menggunakan software statistic SPSS 20.1

HASIL DAN PEMBAHASAN

Daun sungkai dilakukan maserasi bertingkat dimulai dari pelarut nonpolar berupa n-heksana, semipolar berupa etil asetat dan polar berupa metanol. Maserasi dilakukan selama 2x24 dengan 2 kali pengulangan. Dari 1003 gram sampel kering daun sungkai diperoleh ekstrak etil asetat sebanyak 34,7 gram dan %rendemennya sebesar 3,4596%. Hasil skrining fitokimia ekstrak daun sungkai disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil skrining fitokimia ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol daun sungkai

Metabolit Sekunder	Hasil			Keterangan
	n-Heksana	Etil Asetat	Metanol	
Alkaloid				
• Pereaksi Dragendorff	+	-	-	• Endapan merah hingga jingga
Flavonoid	-	+	+	Terbentuk buih, warna jingga
Saponin	-	-	+	Busa yang stabil
Tanin/fenolik	-	+	+	Warna hijau kehitaman
Steroid	-	+	-	Warna biru atau hijau
Triterpenoid	-	-	-	Warna ungu atau jingga

* Keterangan

(+): Terdapat senyawa metabolit sekunder

(-): Tidak terdapat senyawa metabolit sekunder

Berdasarkan data tabel 1 diketahui bahwa senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak etil asetat daun sungkai yaitu golongan flavonoid, tanin/fenolik dan steroid sesuai dengan penelitian Pindan et al., (2021).

Isolasi senyawa

Isolasi senyawa dilakukan menggunakan metode kromatografi vakum cair (KVC). Sebanyak 15 gram gram ekstrak etil asetat daun sungkai diimpregnasi dengan 15 gram silika gel. Fasa diam yang digunakan yaitu silika gel sebanyak 40 gram dan fasa gerak berupa pelarut dengan kepolaran bertingkat yaitu n-heksana 100%: n-heksana: etil asetat dan etil asetat: metanol sampai metanol 100%. Hasil pemisahan menggunakan Kromatografi Vakum Cair (KVC) diperoleh 40 vial dan diupkan pelarutnya. Pada masing-masing vial dilakukan kromatografi lapis

tipis (KLT) untuk melihat pola noda hasil pemisahan. Dari hasil KLT, vial-vial tersebut digabungkan berdasarkan pola noda yang sama sehingga diperoleh tiga fraksi berbeda, yaitu vial 1-8 (fraksi 1), vial 9-12 (fraksi 2), dan vial 13-40 (fraksi 3).

Berdasarkan hasil tampungan vial 13 (F3) terdapat endapan berwarna putih pada dasar vial yang diduga sebagai isolat. Kemudian endapan yang diperoleh dicuci menggunakan n-heksana dan etil asetat untuk menghilangkan pengotor yang terdapat pada endapan. Hasil yang diperoleh setelah dilakukan pencucian yaitu berupa butiran kristal berwarna putih. Isolat dari F3 yang didapat sebanyak 0,973 mg, kemudian isolat dilakukan skrining fitokimia untuk mengetahui golongan senyawa. Kristal yang telah dicuci ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. Isolat F3

Hasil skrining fitokimia isolat F3 pada tabel 2 menunjukkan bahwa isolat hanya positif terhadap satu uji yaitu golongan steroid. Selanjutnya diuji kemurnian isolat F3 dengan metode KLT menggunakan sistem tiga eluen dengan pelarut dan perbandingan yang berbeda.

Tabel 2. Skrining Fitokimia Isolat F3

Metabolit Sekunder	Hasil	Keterangan
Alkaloid	-	• Endapan merah hingga jingga
• Pereaksi Dragendorff	-	• Endapan putih kekuningan
• Pereaksi Meyer	-	Terbentuk buih, warna jingga
Flavonoid	-	Busa yang stabil
Saponin	-	Warna hijau kehitaman
Tanin/fenolik	-	Warna biru atau hijau
Steroid	+	Warna ungu atau jingga
Triterpenoid	-	

Keterangan

(+) : Terdapat senyawa metabolit sekunder

(-) : Tidak terdapat senyawa metabolit sekunder

Hal ini bertujuan untuk melihat kemurnian dari suatu isolat yang ditunjukkan dengan munculnya satu noda pada tiap KLT. Adanya noda tunggal pada beberapa uji KLT menunjukkan bahwa sudah diperoleh senyawa dengan tingkat kemurnian tinggi. Hasil uji KLT untuk menentukan kemurnian isolat menggunakan sistem tiga eluen berbeda dapat dilihat pada gambar 2.



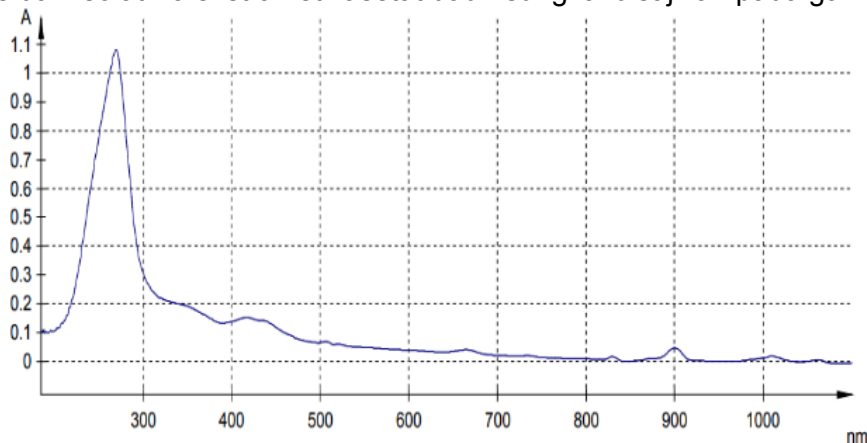
Gambar 2. Uji kemurnian KLT sistem 3 jenis eluen, (i) DCM:Aseton (2:8),

(ii) Etil asetat:Metanol (4:6), (iii) Aseton:Metanol (6:4)

Dari hasil KLT isolat F3 menggunakan 3 jenis eluen menunjukkan pola noda tunggal sehingga diindikasikan senyawa yang terdapat pada isolat F3 sudah murni.

Karakterisasi Senyawa Hasil Isolasi

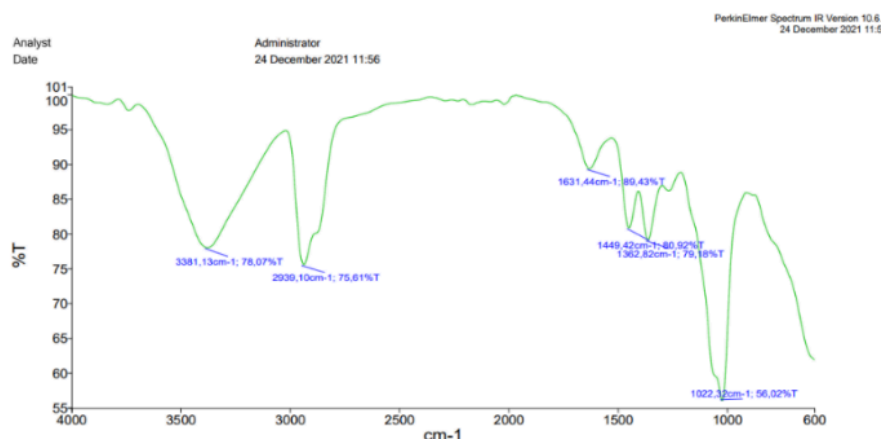
Spektrum UV-Vis dari isolat F3 ekstrak etil asetat daun sungkai disajikan pada gambar 3.



Gambar 3. Spektrum UV-Vis dari isolat F3 ekstrak etil asetat daun sungkai

Berdasarkan spektrum UV-Vis pada gambar 3 menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 267 nm ($Abs=1,0609$). Data spektrum UV-Vis isolat F3 menunjukkan adanya transisi elektron $\pi \rightarrow \pi^*$ yang menunjukkan adanya suatu kromofor $C=C$ yang merupakan ikatan rangkap nonkonjugasi. Berdasarkan perbandingan literatur, spektrum UV-Vis isolat F3 hampir memiliki kemiripan pola dengan dengan spektrum UV-Vis senyawa golongan steroid yaitu β -Sitosterol (Rathee et al., 2012).

Spektrum FTIR dari isolat F3 ekstrak etil asetat daun sungkai disajikan pada gambar 4.



Gambar 4. Spektrum FTIR isolat F3 ekstrak etil asetat daun sungkai

Spektrum FTIR isolat F3 (gambar 4) menunjukkan serapan pada bilangan gelombang 3381,13 cm^{-1} dengan intensitas melebar yang merupakan ciri khas serapan untuk gugus fungsi $-OH$. Hal ini diperkuat oleh serapan pada bilangan gelombang 1022,32 cm^{-1} sebagai vibrasi ulur ikatan $C-O$. Serapan pada bilangan gelombang 2939,10 cm^{-1} dengan intensitas tajam menunjukkan serapan untuk gugus fungsi $C-H$ alifatik. Serapan pada bilangan gelombang 1631,44 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus fungsi $C=C$. Munculnya serapan pada bilangan gelombang 1449,42

cm⁻¹ dan 1362,82 menunjukkan adanya vibrasi ulur ikatan C-H (alkana) alifatik yang mengindikasikan adanya gugus metil (CH₃) dan metilena (CH₂). Pada puncak regang C-H alifatik pada daerah (2939,10 cm⁻¹ dan gugus C=C (1631,44 cm⁻¹) dari hasil karakterisasi pada isolat F3 menunjukkan adanya kerangka senyawa steroid dalam isolat dan regang C-O (1022,32 cm⁻¹) juga mendukung bahwa isolat merupakan senyawa steroid karena memiliki gugus hidroksil.

Berdasarkan hasil analisa FTIR isolat F3 dihasilkan serapan pada berbagai bilangan gelombang yang memiliki kemiripan dengan data spektrum FTIR β- Sitosterol (Rathee et al., 2012; Ododo et al., 2016); Mukharromah dan Suyatno, 2014) dan kemudian dibandingkan dengan serapan senyawa β- Sitosterol murni penelitian Creswell et al., (1982) dalam Anwar et al., (2021). Perbandingan data spektrum FTIR dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Perbandingan data spektrum FTIR isolat F3 dengan beberapa literatur

Isolat F3 (cm ⁻¹)	Bilangan gelombang β- Sitosterol (cm ⁻¹)			Pustaka**** (cm ⁻¹)	Gugus Fungsi
	*	**	***		
3381,13	3439,68	3427,85	3432,45	3450-3200	O-H
2939,10	2923,93	2959,64	2943,57	2800-3000	C-H alifatik
	2852,92	2852,27	2363,04		
	1736,80	1641,91	1646,37		
1631,44	1736,80	1641,91	1646,37	1680-1620	C=C
1449,42	1463,81	1464,59	1457,44	1475-1300	C-H (pada CH ₂)
1362,82	1377,24	1382,09	1374,42	1475-1300	C-H (pada CH ₃)
1022,32	1011,10	1052,35	1045,70	1050-1260	C-O alkohol

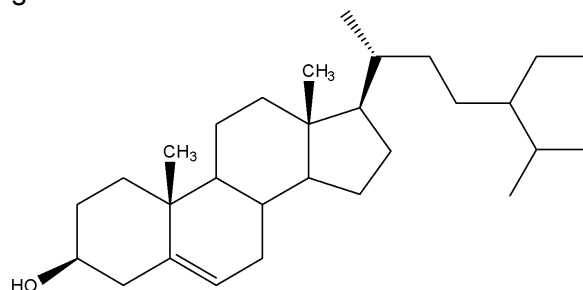
*Rathee et al., 2012.

**Ododo et al., 2016.

*** Mukharromah dan Suyatno, 2014.

**** Creswell et al., 1982 dalam Anwar et al., 2021.

Dugaan bahwa isolat F3 merupakan β-Sitosterol diperkuat dengan bentuk isolat yang diperoleh yaitu berbentuk serbuk berwarna putih. Senyawa β-sitosterol mempunyai karakteristik antara lain berwarna putih, berbau yang khas, bersifat hidrofobik, dan larut dalam etanol dan kloroform serta tidak larut dalam air (Saeidnia et al., 2014). Hasil skrining fitokimia isolat dengan pereaksi Liebermann-Burchard menghasilkan larutan berwarna hijau menunjukkan isolat F3 positif sebagai steroid. Dengan demikian, diduga bahwa isolat F3 hasil isolasi dari ekstrak etil asetat *Peronema canescens* Jack merupakan senyawa turunan steroid yaitu β-Sitosterol yang mempunyai nama IUPAC stigmast-5-en-3β-ol senyawa tersebut merupakan kelompok stigmastan dalam hidrokarbon induk steroid yang memiliki rumus molekul C₂₉H₅₀O. Struktur β-Sitosterol disajikan pada gambar 5.



Gambar 5. Struktur β-Sitosterol (Saeidnia et al., 2014)

Uji Aktivitas Imunomodulator

Pengujian aktivitas imunomodulator pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek imunomodulator ekstrak etil asetat dan isolat F3 daun sungkai terhadap peningkatan jumlah leukosit dan peningkatan aktivitas fagositosis makrofag pada hewan percobaan. Hewan

percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah 18 ekor mencit putih jantan (*Mus musculus*) berusia 8 minggu dengan berat badan sekitar 20-35 gram.

Ekstrak etil asetat daun sungkai divariasikan menjadi 3 dosis, yaitu dosis I 50 mg/Kgbb, dosis II 150 mg/Kgbb dan dosis III 450 mg/Kgbb. Variasi dosis bertujuan untuk mengetahui pada dosis berapa ekstrak daun sungkai memiliki aktivitas sebagai imunomodulator. Kontrol positif yang digunakan adalah *Imboost force* dosis 0,7 mg/Kgbb. Pemilihan *imboost force* karena telah terbukti sebagai imunomodulator, dengan cara memberikan rangsangan kepada reseptor sel imun serta mengirimkan sinyal intraseluler pada reseptor sel sehingga dapat meningkatkan kerja sel imun lebih baik (Febriana, 2015). Sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah Na-CMC 0,5%. Pemilihan Na-CMC sebagai kontrol negatif karena Na-CMC tidak mengandung zat aktif sehingga tidak dapat memberikan efek farmakologi apapun pada hewan uji. Na-CMC pada penelitian ini juga digunakan sebagai pensuspensi dalam sediaan yang dibuat, karena mempunyai sifat yang inert, menghasilkan suspensi yang stabil serta tingkat kejernihannya tinggi. Penentuan jumlah leukosit

Leukosit merupakan salah satu komponen darah yang menjadi bagian dari sistem kekebalan tubuh atau imun. Jumlah leukosit dan sistem imun merupakan satu kesatuan yang saling berhubungan. Apabila terdapat pengaruh jumlah terhadap leukosit maka berpengaruh pula pada sistem imun. Data hasil penentuan jumlah leukosit pada mencit yang diberikan ekstrak etil asetat dan isolat F3 daun sungkai dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Jumlah Leukosit

Kelompok Perlakuan	Jumlah Sel Leukosit ($10^3/\mu\text{l}$)			Rata-rata \pm SEM
	I	II	III	
K- (Na-CMC 0,5%)	5,7	6,2	6,5	6,13 ^a \pm 0,233
K+ (<i>Imboost</i> 0,7 mg/Kgbb)	9,0	10,3	9,6	9,63 ^c \pm 0,650
P1 (EEADS 50 mg/Kgbb)	6,9	6,4	6,7	6,67 ^{ab} \pm 0,145
P2 (EEADS 150 mg/Kgbb)	8,0	7,1	7,4	7,50 ^b \pm 0,264
P3 (EEADS 450 mg/Kgbb)	8,9	9,4	9,0	9,10 ^c \pm 0,152
P4 (Isolat 0,7 mg/Kgbb)	6,0	6,9	6,1	6,33 ^{ab} \pm 0,284

Keterangan:

- Superskrip dengan huruf kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).
- EEADS = Ekstrak etil asetat daun sungkai; P = Perlakuan

Data hasil pengamatan jumlah sel leukosit pada Tabel 7 dilanjutkan pengujian statistik menggunakan SPSS (Statistical Package For Social Science) dengan metode ANOVA (Analysis of Variance) satu arah untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan pemberian isolat dan ekstrak etil asetat daun sungkai pada berbagai dosis terhadap peningkatan jumlah sel leukosit. Sebelum dilakukan pengujian ANOVA terlebih dahulu harus dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas. Uji normalitas bertujuan untuk mengetahui apakah data terdistribusi secara normal ($\text{sig} > 0,05$) atau tidak ($\text{sig} < 0,05$). Hasil uji normalitas Shapiro-Wilk (Lampiran 7) menyatakan bahwa data telah terdistribusi secara normal ($P > 0,05$). Sedangkan uji homogenitas bertujuan untuk menentukan apakah dari beberapa kelompok perlakuan memiliki varian yang sama ($\text{sig} > 0,05$) atau tidak ($\text{sig} < 0,05$). Berdasarkan hasil uji homogenitas diketahui bahwa data memiliki nilai signifikansi $0,619 > P (0,05)$ dapat dikatakan bahwa data memiliki variansi yang sama/homogen, sehingga dapat dilanjutkan pada pengujian ANOVA. Pengujian ANOVA yang dilakukan bertujuan untuk melihat adanya perbedaan dari variasi dosis pemberian ekstrak etil asetat daun sungkai terhadap peningkatan jumlah leukosit. Berdasarkan hasil uji ANOVA one way test diketahui bahwa data memiliki nilai ($\text{sig} < 0,05$) hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak dan isolat etil asetat daun sungkai pada masing-masing kelompok terdapat pengaruh yang signifikan, oleh

karena itu analisis selanjutnya dilakukan uji post hoc Tukey untuk melihat perbedaan kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Hasil analisis menunjukkan bahwa jumlah leukosit pada kelompok ekstrak dan isolat pada masing-masing perlakuan lebih rendah daripada kontrol positif (K+) nyata lebih besar daripada kontrol negatif (K-).

Nilai rata-rata perlakuan kontrol positif (K+) lebih tinggi dari pada perlakuan kontrol negatif (K-). Perlakuan ekstrak dengan tiga jenis dosis daun sungkai menunjukkan adanya peningkatan grafik dari P1 (Dosis 50 mg/Kgbb), P2 (Dosis 150 mg/Kgbb) dan P3 (Dosis 450 mg/kgbb) lebih tinggi dari pada kontrol negatif (K-). Sedangkan jumlah leukosit pada P4 (isolat) masih dalam jumlah yang lebih rendah dari K+, P1, P2 dan P3, namun terdapat peningkatan jumlah leukosit dari pada perlakuan kontrol negatif (K-). Rendahnya jumlah leukosit pada P4 (isolat dosis 0,7 mg/Kgbb) disebabkan oleh belum efektifnya pengaruh isolat dikarenakan dosisnya masih rendah sehingga belum menunjukkan pengaruh yang berbeda nyata. Walaupun demikian, dari P1, P2 dan P3 menunjukkan adanya peningkatan jumlah leukosit seiring peningkatan dosis ekstrak yang digunakan. Peningkatan jumlah leukosit tersebut masih berada dalam batas jumlah leukosit mencit yang normal yaitu antara 2.000 sel/ μ L – 10.000 sel/ μ L darah (Bolliger dan Everds, 2012). Dari hasil penelitian ini peningkatan sistem imun masih berada dalam rentang yang masih kecil tetapi cukup memperlihatkan adanya peningkatan jumlah leukosit yang signifikan. Peningkatan jumlah leukosit merupakan respon tubuh terhadap agen imunomodulator berupa senyawa-senyawa dari daun sungkai. Pada pemberian ekstrak dan isolat etil asetat daun sungkai efek yang diberikan oleh tubuh mencit ialah berupa peningkatan produksi leukosit sehingga jumlahnya meningkat dibanding tanpa pemberian ekstrak

Uji Fagositosis

Tabel 5. Aktivitas Fagositosis Makrofag Aktif

Kelompok Perlakuan	Jumlah sel yang teraktivasi (%)			Rata-rata \pm SEM
	I	II	III	
K- (Na-CMC 0,5%)	35	30	29	31,33 ^a \pm 1,855
K+ (<i>Imboost</i> 0,7 mg/Kgbb)	61	64	60	61,67 ^d \pm 1,202
P1 (EEADS 50 mg/Kgbb)	41	46	43	43,33 ^{bc} \pm 1,453
P2 (EEADS 150 mg/Kgbb)	42	40	51	44,33 ^{bc} \pm 3,283
P3 (EEADS 450 mg/Kgbb)	50	59	51	53,33 ^{cd} \pm 2,848
P4 (Isolat 0,7 mg/Kgbb)	40	39	35	38 ^{ab} \pm 1,528

Keterangan:

- Superskrip dengan huruf kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$).
- EEADS = Ekstrak etil asetat daun sungkai; P = Perlakuan

Data hasil pengamatan aktivitas fagositosis yang diperoleh dari masing-masing kelompok perlakuan dilakukan pengujian statistik menggunakan SPSS (Statistical Package for Social Science) dengan metode ANOVA one way test. Sebelum dilakukan pengujian ANOVA one way test terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas. Hasil uji normalitas dan homogenitas yaitu didapatkan nilai signifikansi ($p > 0,05$) yang menyatakan bahwa data telah terdistribusi secara normal dan data memiliki variansi yang sama/homogen, sehingga dapat dilanjutkan pada uji ANOVA one way test dan didapatkan nilai statistic $0,000 > p (0,05)$ hal ini menyatakan bahwa terdapat pengaruh nyata pada kelompok uji. Analisis selanjutnya yaitu uji Post Hoc Tukey untuk melihat perbedaan antara kelompok kontrol dan perlakuan. Hasil analisis uji Tukey menunjukkan bahwa P1 dan P2 tidak berbeda nyata dengan P4, P4 tidak berbeda nyata dengan K-, tetapi P1, P2, P4 dan K- berbeda nyata dengan K+ dan P3. Isolat (P4) tidak berbeda nyata dengan K-, P1, P2 dan berbeda nyata dengan P4, K+, yang menunjukkan bahwa isolat (P4) tidak memiliki efek imunomodulator. Sedangkan pada P3 perlakuan ekstrak etil asetat

daun sungkai dengan dosis 450 mg/Kgbb didapatkan % aktivitas fagositosis paling tinggi yang hampir mendekati nilai % aktivitas fagositosis makrofag pada perlakuan kontrol positif (K+) yang diberikan suspensi imboost force yang menunjukkan bahwa pemberian ekstrak dengan dosis 450 mg/Kgbb memiliki aktivitas yang tidak berbeda nyata dengan kontrol positif (K+). Walaupun demikian, dari P1, P2, P3 dan P4 menunjukkan adanya peningkatan aktivitas fagositosis makrofag seiring peningkatan dosis ekstrak dan isolat yang digunakan.

Peningkatan aktivitas fagositosis makrofag merupakan respon tubuh terhadap agen imunomodulator berupa senyawa-senyawa yang terkandung di dalam daun sungkai (*Peronema canescens*). Kandungan dari daun sungkai yang salah satunya yaitu β -Sitosterol dari golongan steroid diduga dapat menjadi penyebab adanya peningkatan aktivitas fagositosis makrofag *Mus musculus*. Berdasarkan literatur, senyawa β -Sitosterol yang diisolasi dari *Hylocereus Polyrhizus* dapat meningkatkan aktivitas fagositosis sel makrofag dan meningkatkan produksi oksida nitrat (Wahdaningsih et al., (2021). Selain memberikan efek imunomodulator, β -Sitosterol juga bersifat sebagai antikolesterol, antidiabetes, antioksidan dan antiinflamasi (Saeidnia et al., 2014).

SIMPULAN

Ekstrak etil asetat daun sungkai (*Peronema canescens* Jack) positif senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid, tannin/fenolik dan steroid. Karakteristik spektrum UV-Vis isolat F3 menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 267 nm. Pada spektrum FTIR, menunjukkan adanya gugus O-H, C-H alifatik, C=C, -C-H dan C-O alkohol, isolat F3 mengandung kerangka senyawa golongan steroid yang diduga senyawa β -Sitosterol. Perlakuan ekstrak etil asetat daun sungkai dosis 50 mg/Kgbb, 150 mg mg/Kgbb dan isolat F3 dosis 0,7 mg/Kgbb tidak berbeda nyata dengan K- dikarenakan dosis yang digunakan masih rendah sehingga belum menunjukkan adanya efek imunomodulator. Sedangkan perlakuan ekstrak pada dosis 450 mg/Kgbb tidak berbeda nyata dengan perlakuan K+ yang menunjukkan adanya efek imunomodulator terhadap *Mus musculus* yang ditandai dengan meningkatnya jumlah leukosit dan aktivitas fagositosis makrofag dibandingkan perlakuan kontrol negatif.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar, R., Iilis, S. A., Farida, P. L., Delia, I., Yenny, F. Y., & Pebrian, D. P. (2021). Senyawa Steroid dari Cocor Bebek (*Kalanchoe tomentosa*) sebagai Antibakteri *Pseudomonas aeruginosa*. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*. 12(2), 202-210.
- Bolliger, Anne, P., & Everds, N., (2012). *The Laboratory Mouse: Haematology of the Mouse*. Elsevier Ltd. All rights reserved.
- Devagaran, T. (2012). Senyawa Imunomodulator dari Tanaman. *Students e-Journal*, 1(1).
- Firani, N. K. (2018). *Mengenal Sel-sel Darah dan Kelainan Darah*. Malang: UB Press.
- Haeria., Nurshalati, T., Nur, H. R. (2017). Uji Efektivitas Imunomodulator Ekstrak Etanol Korteks Kayu Jawa (*Lannea coromandelica* Hout.Merr.) Terhadap Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Makrofag Pada Mencit (*Mus musculus*) Jantan. *JK FIK UINAM*. 5(4), 294-301.
- Harbone, J. B. (1987). *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Ed ke-2*. Terjemahan K. Padmawinata dan I. Soediro. ITB Press. Bandung.
- Irwanto., Riko., Ruyani., Aceng., Yani., & Ariefa, P. (2014). Uji Potensi Ekstrak Daun Muda Sungkai (*Peronema canescens*) Terhadap Imunitas *Mus musculus* Swiss Webster Jantan Serta Implementasinya Sebagai Sumber Belajar Pada Lembar Kegiatan Siswa Tentang Sistem Imun. *Undergraduated thesis*, Universitas Bengkulu.
- Latief, M., Sari, P. M., Fatwa, L. T., Tarigan, I. L., & Rupasinghe, H. P. V. (2021). Antidiabetic Activity of Sungkai (*Peronema canescens* Jack) Leaves Ethanol Extract on the Male Mice Induced Alloxan Monohydrate. *Pharmacology and Clinical Pharmacy Research*, 6(2), 64-74.

- Masurin, S., & Chairul. (2012). Efek Ekstrak Air dan Alkohol pada Siwak (*Salvadora persica L.*) Terhadap Peningkatan Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag. *Media Litbang Kesehatan*, 22 (1).
- Mukharromah, R. R., & Suyatno. (2014). Senyawa Metabolit Sekunder Dari Ekstrak Diklorometana Kulit Batang Bakau Merah (*Rhizophora stylosa*). *UNESA Journal of Chemistry*. 3(3), 154-158.
- Ngajow, M., Jemmy, A., & Vanda, S. K. (2013). Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* secara In Vitro. *Jurnal MIPA Unsrat Online*. 2(2), 128-132.
- Nugroho, Y.A., (2012). Efek Pemberian Kombinasi Buah Sirih (*Piper betle L.*) Fruit, Daun Miyana (*Plectranthus scutellarioides (L.) R. BR.*) Leaf, Madu dan Kuning Telur Terhadap Peningkatan Aktivitas dan Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag. *Media Litbang Kesehatan*, 22 (1).
- Ododo, M. M., Manash, K. C., & Ahmed, H. D. (2016). Structure Elucidation of β -sitosterol With Antibacterial Activity from The Root Bark of Malva Parviflora. *SpringerPlus*. 5(1210), 3-11.
- Rahman, A., Goianda, P. R., Sintia, P., Ine, N., Tiara, N. S., Puspa, D. P., & Septa, P. (2021). Pengaruh pemberian infusa daun sungkai (*Peronema canescens*) Terhadap Jumlah Leukosit pada mencit. *Journal of Healthcare Technology and Medicine*. 7(2), 1-7.
- Ramadenti, F., Sundaryono, A., & Handayani, D. (2017). Uji Fraksi Etil Asetat Daun Sungkai Terhadap Plasmodium Berghei Pada *Mus musculus*. *Alotrop*,(2),94-97.
- Rathee, P., Dharmender, R., Deepti, R., & Sushila, R. (2012). *In-vitro* Cytotoxic activity of β -Sitosterol Triacontenate Isolated from *Capparis decidua* (Forsk.) Edgew, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 225-235.
- Saeidnia, S., Azadeh, M., & Ahmad, R. G. (2014). The Story of Beta-sitosterol. *European Journal of Medicinal Plants*. 4(5), 590-609.
- Suhirman, S., & Ballitro. (2020). Daun sungkai (*Peronema Canescens* Jack) berpotensi sebagai imunomodulator. *Warta penelitian dan pengembangan tanaman industri*. 26(3), 29-31.
- Wahdaningsih, S., Subagus, W., Sugeng, R., & Retno, M., (2021). β -Sitosterol of Red Dragon Fruit (*Hylocereus Polyrhizus*) and Its Response to Macrophage and Nitric Oxide. *Indonesian Journal of Pharmacy*. 32(2), 399-407.
- Yani, A. P. (2013). Kearifan Lokal Penggunaan Tumbuhan Obat oleh Suku Lembak Delapan di Kabupaten Bengkulu Tengah, Bengkulu. *Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung*. Lampung.
- Yani, A. P., Ruyani, A., Ansyori, I., & Irwanto, R. (2014). Uji potensi daun muda sungkai (*Peronema Canescens*) untuk Kesehatan (imunitas) pada mencit (*Mus musculus*). *Seminar nasional XI Pendidikan Biologi FKIP UNS*. 245-250.